

Н.В. Промзелева, В.Н. Зорина, А.И. Баранов, Т.Г. Рябичева, Р.М. Зорина, Н.А. Зорин

Регуляторно-транспортные белки и цитокины сыворотки крови при колоректальном раке

ГБОУ ДПО «Новокузнецкий институт усовершенствования врачей» Минздрава России, г. Новокузнецк

Изучено содержание некоторых цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8, ИФН- γ и VEGF), а также модулирующих их синтез регуляторно-транспортных белков (а2-макроглобулин, а1-антитрипсин, лактоферрин) в крови больных колоректальным раком (КРР) до операции и на 9-10 день после хирургического лечения с применением Ронколейкина в послеоперационном периоде, либо без него. Установлено, что при КРР до операции на фоне сниженного содержания а1-антитрипсина и лактоферрина достоверно повышены концентрации всех изученных цитокинов, кроме VEGF, а также имеется тенденция к снижению а2-макроглобулина, при том, что синтез данных белков ассоциирован с синтезом цитокинов. В послеоперационном периоде существенной нормализации показателей не наблюдалось. После хирургического лечения отмечено увеличение уровня ИЛ-6, концентрация а2-макроглобулина не изменялась. Применение Ронколейкина после оперативного вмешательства привело к снижению а2-макроглобулина при отсутствии повышения уровня ИЛ-6.

Ключевые слова: колоректальный рак, цитокины, ингибиторы протеиназ, лактоферрин, ронколейкин

В 2012 г. в России выявлено около 60 000 случаев заболевания колоректальным раком (КРР), который занял 2-е место в структуре заболеваемости злокачественных опухолей (11,5%). За последние 10 лет темп прироста заболеваемости составил при раке ободочной кишки (РОК) 26,08%, при раке прямой кишки (РПК) – 18,38 % [3]. Скрытое течение, недостаточная настороженность врачей общей лечебной сети, диагностические ошибки, ведут к поздней диагностике. Число запущенных форм при РОК достигло 55,0 %, РПК – 49,2 %, чем в свою очередь обусловлены высокие показатели одногодичной летальности: 29,6 % и 25,8 %, соответственно [4]. Пятилетняя выживаемость при КРР в России остается на низком уровне и не превышает 50%. Одной из причин затруднений при ранней диагностике и лечении КРР

является недостаточная изученность механизмов биорегуляции процессов при злокачественной трансформации. В частности, ряд цитокинов рекомендуется к использованию в диагностике [8,12], а также в комплексном лечении КРР [1,6], однако роль иммуномодуляторных белков, регулирующих их синтез и доставку в клетки-мишени, остается малоизученной. Опубликованы отдельные сообщения о роли лактоферрина (ЛФ) в лечении дисплазии и полипов толстой кишки [7,14], а упоминания об аналогах иммуномодуляторных белков альфа-2-макроглобулина (а2-МГ) и альфа-1-антитрипсина (а1-АТ) встречаются лишь в единичных сообщениях [5].

В этой связи, целью работы явилось комплексное изучение сывороточного содержания цитокинов и иммуномодуляторных белков у больных колоректальным раком.

Материалы и методы

Изучена сыворотка крови 15 больных КРР (68,3±2,7 лет), поступивших в экстренное хирургическое отделение городской больницы №1 г. Новокузнецка с клиникой кишечной непроходимости. Среди них у 7 пациентов - рТ2-3N0-1M0, у 8 — рТ4N0-1M0. Распространенность опухолевого процесса оценивалась по УЗИ органов брюшной полости (ОБП), СКТ грудной клетки и ОБП, фиброколоноскопии и интраоперационным данным. При гистологическом исследовании установлена аденокарцинома различной степени дифференцировки. Всем пациентам выполнены радикальные операции. Послеоперационный период протекал без осложнений. Шести пациентам вводился Ронколейкин (генно-инженерный аналог интерлейкина-2) в послеоперационном периоде (внутривенно капельно, в разовой дозе 0,5 мг на 2-е, 4-е и 6-е сутки в течение 4-х часов), девять пациентов не получали дополнительного лечения. Забор образцов сыворотки проводился при поступлении, а также на 9-10 сутки после операции. Контрольную группу составили 26 практически здоровых людей сравнимого возраста, отобранных в ходе плановой диспансеризации. У всех обследованных получено информированное согласие на участие в исследовании.

Концентрации интерлейкина-2 (ИЛ-2), интерлейкина-6 (ИЛ-6), интерлейкина-8 (ИЛ-8), фактора некроза опухолей-альфа (ФНО- α), интерферона-гамма (ИФН- γ) и фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), а также лактоферрина (ЛФ), определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих наборов (ЗАО «Вектор-Бест», Россия), и оборудования для ИФА (Bio-Rad, США). Концентрации а2-макроглобулина (а2-МГ) и а1-антитрипсина (а1-АТ) определяли методом количе-

ственного низковольтного ракетного иммуноэлектрофореза с использованием исследовательских тест-систем, разработанных на базе НИЛ иммунологии ГБОУ ДПО НГИУВ.

Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи сертифицированной программы для биостатистики InSTAT-2 (GraphPad, США).

Результаты и обсуждение

Иммуномодуляторный а2-МГ является полифункциональным ингибитором гидролаз, транспортером цитокинов, липидов, гормонов и пр., регулирует синтез цитокинов, участвует в распознавании и элиминации патогенов, активно задействован в различных физиологических процессах, развитии воспаления и канцерогенезе [2]. Согласно полученным данным, при КРР концентрации сывороточного а2-МГ имеют тенденцию к снижению до операции и достоверно снижены в послеоперационном периоде (табл. 1).

Причиной этого явления может быть активное связывание гидролаз, высвобождающихся из гибнущих клеток микроокружения опухоли, а также образующихся при воспалительной реакции тканей на операционную травму, с последующим быстрым выведением комплексов фермент-ингибитор из циркуляции посредством эндоцитоза, превышающим по интенсивности синтетический потенциал клеток печени. Однако данное снижение может иметь и позитивный эффект, поскольку дефицит а2-МГ может активировать систему натуральных киллеров [2]. В этой связи дополнительное снижение уровней а2-МГ на фоне применения Ронколейкина может расцениваться и как благоприятный фактор.

Содержание еще одного иммуномодуляторного ингибитора гидролаз серпиновой природы, альфа1-АТ [13], снижено до операции и остается пониженным вне зависимости от вида лечения. Это достаточно необычно, учитывая то, что при классическом воспалении а1-АТ накапливается в циркуляции, как за счет активизации биосинтеза, так и за счет достаточно медленного выведения комплексов фермент-ингибитор из крово-

тока. Учитывая, что уровень а2-МГ при КРР до операции также немного снижен, можно предположить, что при данной патологии наблюдается врожденный дефицит циркулирующих ингибиторов гидролаз, как и при некоторых других заболеваниях [13], и что подобный дефект белкового синтеза может быть одним из триггерных механизмов опухолевой пролиферации.

Лактоферрин обладает не только антибактериальными и противовирусными свойствами, но и выраженной противоопухолевой активностью, оказывая воздействие на клетки как напрямую, так и модулируя синтез цитокинов [10], что позволяет некоторым авторам рекомендовать его при лечении КРР [7]. Согласно полученным результатам, сывороточный уровень ЛФ при КРР был снижен до операции, что совпадает с данными [14], предполагающими, что дефицит ЛФ способствует прогрессии и может быть триггерным фактором канцерогенеза. В послеоперационном периоде уровень ЛФ имел тенденцию к дополнительному снижению, что вероятно способствует рецидиву заболевания при КРР. При применении Ронколейкина содержание ЛФ не повышалось, оставаясь на уровне дооперационного периода, что также можно отнести к благоприятным факторам.

ИЛ-6 может быть как про-, так и противовоспалительным цитокином, но в любом случае является активатором биосинтеза а2-МГ. Согласно результатам исследования (табл. 1), его уровни в крови при КРР повышены до операции, что подтверждается другими авторами [8,9], и увеличиваются в 2,3 раза после, однако данное увеличение концентрации не приводит к соответствующему повышению содержания а2-МГ в крови. Обращает на себя внимание, что при применении Ронколейкина это несоответствие не столь выражено – уровень ИЛ-6 в послеоперационном периоде повышается только в 1,5 раза.

Классический провоспалительный цитокин ФНО-α, напротив, блокирует синтез а2-МГ и

Таблица 1.
Белки и цитокины сыворотки крови при колоректальном раке

Показатели	Контрольная группа (26)	До операции (15)	После операции (9)	После операции+ронколейкин (6)
МГ (г/л)	2,21±0,17	1,96±0,11	1,8±0,13*	1,49±0,23* **
АТ (г/л)	2,73±0,09	2,22±0,19*	2,17±0,2*	2,04±0,28*
ЛФ (мг/л)	0,86±0,07	0,61±0,1*	0,49±0,1*	0,58±0,09*
ФНО-α (пкг/мл)	0	3,4±1,5*	1,4±1,1*	1,8±1,2*
ИЛ-6 (пкг/мл)	1,0±0,3	7,4±1,7*	17,0±4,7* **	11,0±4,0*
ИЛ-8 (пкг/мл)	6,9±0,7	29,9±5,4*	18,2±2,0*	41,9±13,2*
VEGF (пкг/мл)	273±31,7	408±63	324±45	583±121*
ИНФγ (пкг/мл)	0	0	0	0
ИЛ-2 (пкг/мл)	0	0	0	0

Пояснения: в скобках указано количество обследованных, * - P<0,05 по сравнению с показателями контрольной группы; ** P<0,05 - сравнение показателей до и после операции.

стимулирует синтез $\alpha 1$ -АТ [2]. По нашим данным его уровень был повышен при КРР до операции, что совпадает с данными литературы [9, 12] и снижался после операции, при этом не повышалось количество $\alpha 2$ -МГ и не снижался уровень $\alpha 1$ -АТ.

Известно, что ИФН- γ блокирует рецепторы эндцитоза [2] и его пытаются использовать при лечении КРР [11]. По нашим данным ИФН- γ отсутствует в крови при КРР, что частично объясняет дефицит ингибиторов протеиназ ($\alpha 2$ -МГ и $\alpha 1$ -АТ) вследствие их активного беспрепятственного поглощения.

Эндогенный ИЛ-2 относится к факторам, регулирующим иммунную защиту при злокачественных опухолях. Применение Ронколейкина восстанавливает синтез эндогенного ИЛ-2, активированного CD4⁺ и CD8⁺, а также компенсирует его дефицит [1]. В нашем исследовании ИЛ-2 не определялся в крови больных как до, так и после введения его генно-инженерного аналога (Ронколейкина) в послеоперационном периоде. Возможно, повышение уровня эндогенного ИЛ-2 можно ожидать при других режимах иммунотерапии Ронколейкином.

ИЛ-8 относится к семейству хемокинов и стимулирует синтез лактоферрина. В исследуемой группе больных КРР его концентрация в сыворотке крови до операции по сравнению со здоровыми увеличена в 4 раза, что совпадает с данным литературы [5,8,12]. В то же время соответствующей активации синтеза ЛФ не наблюдается. После операции его уровень снижается, однако при применении Ронколейкина возникает тенденция к дополнительному повышению уровня ИЛ-8.

Содержание VEGF, способствующего неоангиогенезу и усилению кровоснабжения злокачественной опухоли, было подвержено высокой индивидуальной вариабельности, что не позволило подтвердить достоверность повышения его уровня до операции, отмечаемого другими авторами как в крови [9], так и в опухолевой ткани [8]. Нами выявлено, что концентрация данного цитокина достоверно выше в группе больных, получавших Ронколейкин после операции, что возможно связано с его стимулирующим влиянием на выработку VEGF тканями в области послеоперационной раны и требует дальнейшего изучения.

Таким образом, у больных КРР наблюдается выраженная дискоординация цитокиновой регуляции, когда секреция индуктора не вызывает активации биосинтеза соответствующего белка и возрастает гидролазный (в т.ч. протеиназный) потенциал крови, вследствие чего резко снижается резерв ингибиторов данных ферментов. В этой связи представляется целесообразным вве-

дение в программу иммунотерапии различных аналогов человеческих цитокинов, в частности Ронколейкина, способных оказать влияние на цитокиновый профиль и, возможно, на синтез ассоциированных с синтезом соответствующих иммунорегуляторных белков, участвующих в канцерогенезе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Егорова В.Н., Попович А.М., Бабаченко И.В. и др. Интерлейкин – 2: обобщенный опыт клинического применения // УльтраПринт. – СПб. – 2012. – 97 с.
2. Зорин Н.А., Зорина В.Н., Зорина Р.М. Роль альфа-2-макроглобулина при онкологических заболеваниях // *Вопр. онкол.* – 2004, - Т. 50. - № 5. - С. 515-519.
3. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2012 году (заболеваемость и смертность) // РИИС ФИАН. – М. - 2014. – 250 с.
4. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Состояние онкологической помощи населению России в 2012 году // РИИС ФИАН. – М. - 2013. – 231 с.
5. Choi J.W., Liu H., Shin D.H. et al. Proteomic and cytokine plasma biomarkers for predicting progression from colorectal adenoma to carcinoma in human patients // *Proteomics.* - 2013.- Vol. 13 (15). – P. 2361-2374.
6. Hernandez-Alcoceba R., Sangro B., Berraondo P. et al. Cytokines for the treatment of gastrointestinal cancers: clinical experience and new perspectives // *Expert Opin Investig Drugs.* - 2013.- Vol. 22 (7). – P. 827-841.
7. Iigo M., Alexander D.B., Xu J. et al. Inhibition of intestinal polyp growth by oral ingestion of bovine lactoferrin and immune cells in the large intestine // *Biomaterials.* - 2014. - Vol. 27 (5). – P. 1017-1029.
8. Kim Y.W., Kim S.K., Kim C.S. et al. Association of serum and intratumoral cytokine profiles with tumor stage and neutrophil lymphocyte ratio in colorectal cancer // *Anti-cancer Res.* - 2014. – Vol. 34 (7). – P. 3481-3487.
9. Krzystek-Korpaczka M, Diakowska D, Kapturkiewicz B. et al. Profiles of circulating inflammatory cytokines in colorectal cancer (CRC), high cancer risk conditions, and health are distinct. Possible implications for CRC screening and surveillance // *Cancer Lett.* - 2013. – Vol. 337 (1). – P. 107-114.
10. Legrand D., Ellass E., Carpenter M., Mazurer J. Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses // *Cell. Mol. Life Sci.* - 2005. – Vol. 62. – P. 2549-2559.
11. Ni C, Wu P, Zhu X. et al. IFN- selectively exerts pro-apoptotic effects on tumor-initiating label-retaining colon cancer cells // *Cancer Lett.* – 2013. – Vol. 336 (1). - 174-184.
12. Pengjun Z., Xinyu W., Feng G. et al. Multiplexed cytokine profiling of serum for detection of colorectal cancer // *Future Oncol.* - 2013. – Vol. 9 (7). – P. 1017-1027.
13. Wanner A., Arce A.D., Pardee E. Novel therapeutic uses of alpha-1 antitrypsin a window to the future // *COPD.* – 2012. – Vol. 9 (6). – P. 583-588.
14. Ye Q., Zheng Y., Fan S. et al. Lactoferrin deficiency promotes colitis-associated colorectal dysplasia in mice // *PLoS One.* - 2014. – Vol. 24. - 9 (7). – P. e103298.

Поступила в редакцию 10.12. 2014 г.

*N.V.Promzeleva, V.N.Zorina, A.I.Baranov,
T.G.Ryabicheva, R.M.Zorina, N.A.Zorin*

**Regulatory and transport proteins and
cytokines in blood serum in colorectal cancer**

Novokuznetsk Institute of Postgraduate Medical Education

There was investigated the serum levels of IL-2, IL-6, IL-8, IFN- γ , VEGF and some immunomodulatory proteins (α 2-macroglobulin, α 1-antitrypsin, lactoferrin), which regulated its transport and synthesis in blood samples from patients with colorectal cancer prior to surgery and on the day 9-10 after surgical treatment with using Roncoleukin in postoperative period or without it. It was found that the concentrations of all cytokines (except VEGF) were significantly increased and the proteins levels were decreased before surgery and mostly remain unchanged after it. The surgery promoted increasing of IL-6 level without significant changes of α 2-macroglobulin concentration, whereas the addition of Roncoleukin after surgery decreased α -macroglobulin serum concentration and IL-6 level remained stable.

Key words: colorectal cancer, cytokine, proteinase inhibitor, lactoferrin, Roncoleukin